

Д. С. Королёва

**РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО
ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВОДОРАСТВОРИМЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ
В ТРАВЕ ЧЕРНОГОЛОВКИ ЛЕКАРСТВЕННОЙ****Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет**

Разработана методика количественного определения суммы полисахаридов в траве черноголовки лекарственной. Подобраны оптимальные условия экстракции комплекса полисахаридов из травы черноголовки лекарственной (однократная экстракция горячей водой (в момент подачи на сырьё), время экстракции – 30 минут, температура экстракции – 80 °С, соотношение сырья и экстрагента – 1:50, измельченность сырья – 1 мм). Методика валидирована по показателям «специфичность», «правильность», «сходимость» и «внутрилабораторная точность».

Ключевые слова: *черноголовки лекарственной трава, комплекс водорастворимых полисахаридов, количественное определение, валидация.*

ВВЕДЕНИЕ

О применении полисахаридов в медицине и фармации известно давно, что связано с достаточной легкостью их выделения и большим спектром фармакологической активности. Полисахариды – большая группа природных высокомолекулярных веществ, состоящих из остатков моносахаридов, соединенных между собой О-гликозидными связями [1].

Перспективным отечественным источником биологически активных водорастворимых полисахаридов может являться черноголовка лекарственная (*Prunella vulgaris L.*). Растение широко распространено на территории Республики Беларусь и обладает широким спектром фармакологической активности [2–4].

Из водного экстракта черноголовки лекарственной был выделен серосодержащий полисахарид прунеллин [5], обладающий активностью против вируса иммунодефицита человека, что было доказано *in vitro* [6]. Клинически была доказана целесообразность использования водного извлечения из изучаемого растения при герпетическом кератите, так как при использовании черноголовки лекарственной наблюдалась выработка антител к вирусу простого герпеса типа 1 (ВПГ-1). Позднее было установлено влияние полисахаридов черноголовки на вирус простого герпеса типа 2 (ВПГ-2) в концентрации 20,1 мкг/мл, также наблюдалась эффективность к ацикловир-устойчивым штаммам ВПГ-1 [7–9].

Было выявлено иммуномодулирующее действие фракции, содержащей поли-

сахаридный комплекс и стимулирующей выработку оксида азота из макрофагов RAW264.7 и BV2 клеток головного мозга мышей [10]. Также были доказаны противоаллергический [11] и антимуtagenный эффекты [12].

Возможность использования нового вида лекарственного сырья в научной медицине делает необходимой разработку методик количественного определения групп действующих веществ, обуславливающих фармакологическую активность растения, а также проведение их валидации. На сегодняшний день существует много методов количественного определения полисахаридов в лекарственном растительном сырье (спектрофотометрический метод, иммуноферментный анализ по реакции антиген-антитело для экстрактов эхинацеи пурпурной, применение ультразвука, а также использование гель-хроматографии), многие из которых требуют использования оборудования. В Государственной фармакопее Республики Беларусь для количественного определения полисахаридного комплекса применяется гравиметрический метод анализа, который является довольно простым в исполнении и не требующим дополнительного оборудования.

Цель исследования – разработка и валидация методики количественного определения суммы полисахаридов в траве черноголовки.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования являлась трава черноголовки лекарственной. Образцы

исследуемого сырья были заготовлены летом 2016 года и летом 2017 года в местах естественного произрастания.

Для разработки методики количественного определения комплекса водорастворимых полисахаридов в лекарственном сырье использовали гравиметрический метод, который основан на экстракции суммы полисахаридов из лекарственного сырья водой с последующим их осаждением спиртом (96%, об/об) *P*. Этот метод рекомендуется Государственной фармакопеей Республики Беларусь для анализа сырья, содержащего полисахариды [13].

Количество розмариновой кислоты в полученном после осаждения водного извлечения травы черноголовки лекарственной осадке для подтверждения специфичности методики определяли методом жидкостной хроматографии. Исследование проводили на жидкостном хроматографе Agilent 1260 (Hewlett Packard, США – Германия), сбор данных, обработку хроматограмм и спектров поглощения проводили с помощью программы Agilent ChemStation for LC 3D. В работе использовали хроматографическую колонку Zorbax SB 4,6×250 мм, заполненную силикагелем октильным 5 мкм; температура колонки составила 30°C; длина волны детекции 330 нм; скорость подвижной фазы 1,0 мл/мин; объем вводимой пробы 10 мкл. Для приготовления подвижной фазы использовали 0,03 М раствор калия дигидрофосфата *P*, доведенный кислотой фосфорной *P* до pH=3,0, и аце-

тонитрил *P* в соотношении 80:20 (об/об). Полученную смесь пропускали через мембранный фильтр, диаметр пор которого составил 0,45 мкм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Первым этапом нашего исследования был подбор температуры экстрагента. В эксперименте мы использовали воду комнатной температуры и горячую воду (рисунок 1), соотношение сырья и экстрагента 1:10 [14].

Как видно из рисунка 1, наилучшая степень извлечения суммы полисахаридов достигается при использовании горячей воды (в момент подачи на сырье) в качестве экстрагента, что согласуется с литературными данными [15].

Важным фактором, который необходимо учитывать при анализе лекарственного растительного сырья, является соотношение используемого экстрагента и анализируемого сырья. На основании полученных данных, представленных на рисунке 2, можно сделать заключение, что максимальный выход полисахаридов отмечается при соотношении сырья и экстрагента 1:50.

Максимальное содержание суммы полисахаридов наблюдалось при экстракции в течение 30 мин (рисунок 3). При дальнейшем экстрагировании происходило снижение содержания исследуемых соединений, что обусловлено, вероятно, разрушением их структуры.

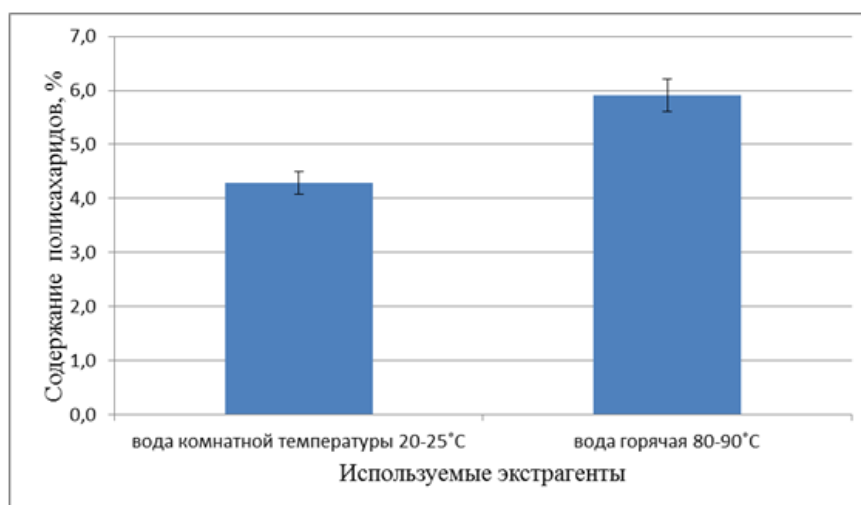


Рисунок 1. – Зависимость полноты экстракции суммы полисахаридов из травы черноголовки лекарственной от использования воды комнатной температуры и воды горячей (n = 3, P = 95%)

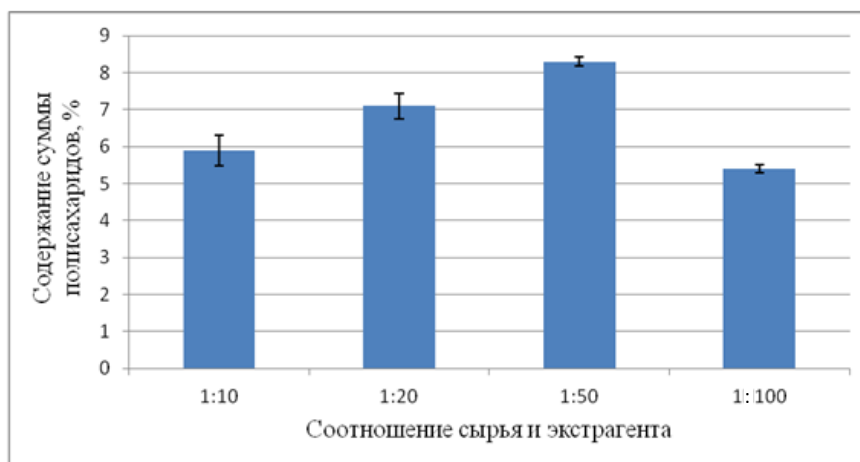


Рисунок 2. – Влияние соотношения сырья и экстрагента на извлечение суммы полисахаридов из травы черноголовки лекарственной (n = 3, P = 95%)

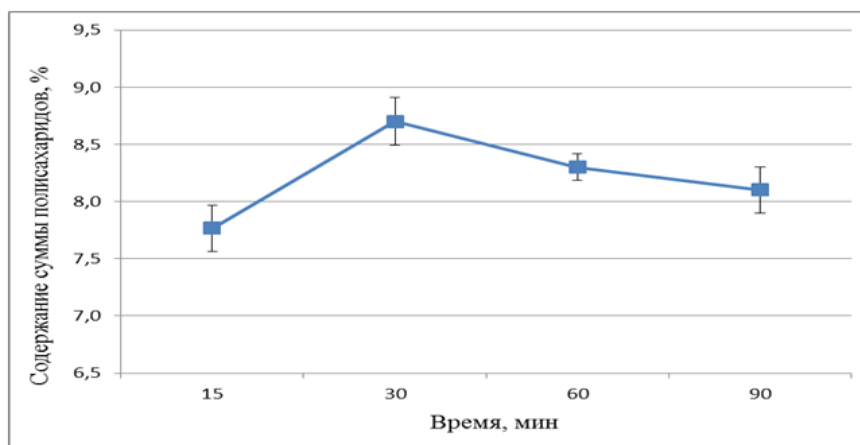


Рисунок 3. – Влияние времени экстракции на извлечение суммы полисахаридов из травы черноголовки лекарственной (n = 3, P = 95%)

Немаловажную роль в процессе извлечения действующих веществ играет размер частиц анализируемого сырья. Известно, что измельченность оказывает влияние на процесс диффузии веществ из лекарственного сырья в экстрагент. При этом использование сырья с низкой степенью измельчения является нежелательным из-за образования устойчивой суспензии, а крупные частицы не позволяют извлечь вещества в полной мере.

Влияние измельченности исследуемого сырья на извлекаемость комплекса полисахаридов из травы черноголовки лекарственной представлено на рисунке 4, из которого следует, что с увеличением размера частиц сырья происходит уменьшение выхода суммы полисахаридов. Оптимальным является лекарственное сырье, частицы которого проходят сквозь сито с диа-

метром отверстий 1 мм. При дальнейшем измельчении сырье превращается в пыль, что сильно затрудняет процесс фильтрации полученных извлечений.

Увеличение кратности экстракции не способствовало увеличению выхода суммы полисахаридов (таблица 1). При дальнейшем исследовании использовали однократную экстракцию в течение 30 минут.

Следующим этапом был подбор температурного режима экстракции (рисунок 5).

При температуре экстракции 40°C содержание комплекса полисахаридов в получаемом экстракте из травы черноголовки лекарственной минимальное, что, вероятно, обусловлено активацией ферментов растения, которые вызывают деструкцию полисахаридов. При дальнейшем увеличении температуры происходит статистически достоверное увеличение количественного

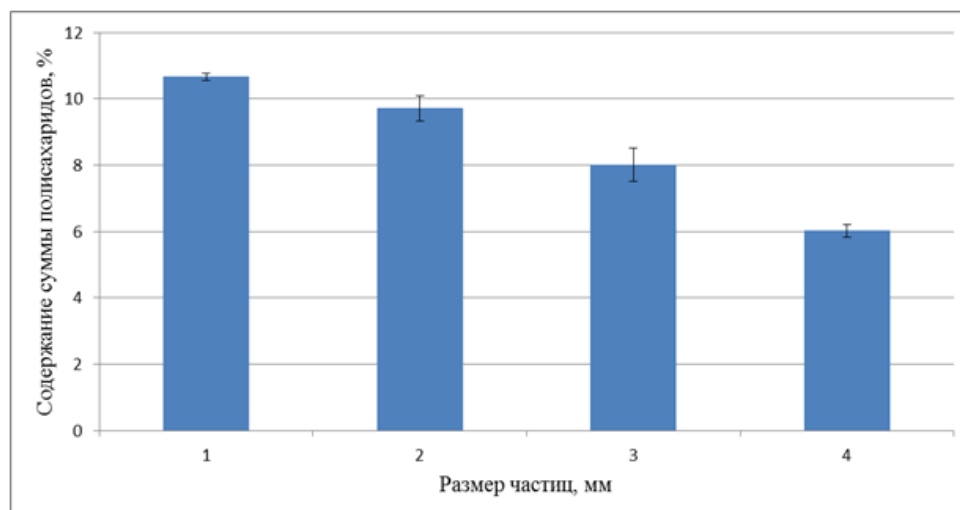


Рисунок 4. – Зависимость полноты экстракции суммы полисахаридов от измельченности порошка травы черноголовки лекарственной (n = 3, P = 95%)

Таблица 1. – Влияние кратности экстракции на извлекаемость суммы полисахаридов из травы черноголовки лекарственной

Кратность экстракции	Содержание суммы полисахаридов, %	RSD, %
однократная	9,72	0,5
двукратная	7,61	1,6

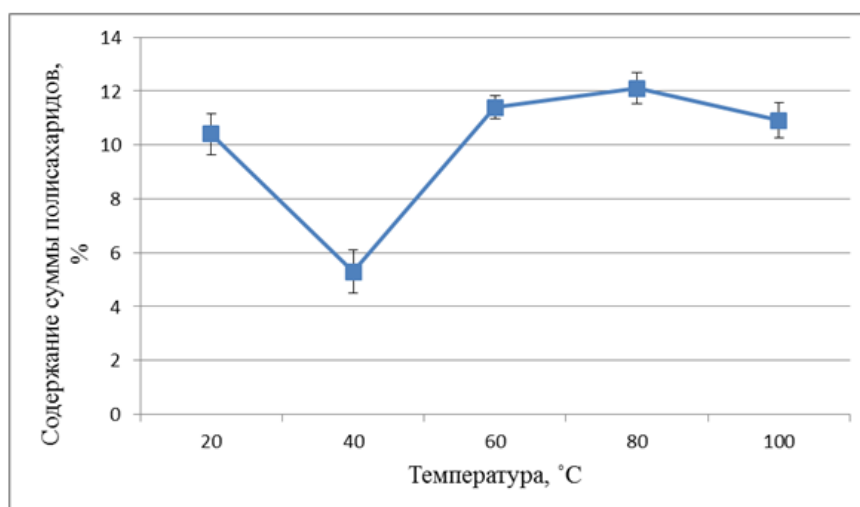


Рисунок 5. – Влияние температуры экстракции на извлечение суммы полисахаридов из травы черноголовки лекарственной (n = 3, P = 95%)

содержания исследуемой группы веществ в приготовленном извлечении из травы черноголовки лекарственной, которое достигает максимума к 80°C и также плавно затем начинает снижаться. В дальнейшем исследовании использовали температуру экстракции, которая составила 80°C.

Далее подбирали оптимальные условия осаждения суммы полисахаридов. Результаты проведенного исследования представлены в таблице 2.

Сумма полисахаридов, осаждаемая 96% спиртом Р, при соотношении объемов экстракта травы черноголовки лекарственной и 96% спирта Р 1:3, статистически достоверно отличается от таковой, осаждаемой при соотношении извлечения и 96% спирта Р 1:2. Статистических различий в количестве полисахаридов, осаждаемом при использовании трехкратного и четырехкратного объемов 96% спирта Р, найдено не было.

Таблица 2. – Влияние соотношения объемов извлечения и 96% спирта Р и времени на количество осаждаемых полисахаридов из водного извлечения травы черноголовки лекарственной

Показатель	Значение показателя	Содержание полисахаридов, %	RSD, %
Соотношение объемов извлечения и 96% спирта Р	1:1	5,4	2,81
	1:2	9,45	1,61
	1:3	10,9	1,83
	1:4	11,0	1,89
Время осаждения, мин	15	10,9	1,39
	20	11,0	2,10
	30	11,03	2,09

Таким образом, в целях рационального использования реактивов в дальнейшем для осаждения суммы полисахаридов из водного извлечения травы черноголовки лекарственной применяли трехкратный объем 96% спирта Р.

Увеличение времени осаждения с 15 до 30 минут не способствовало увеличению выхода полисахаридов из извлечения.

Валидацию методики количественного определения комплекса водорастворимых полисахаридов в траве черноголовки лекарственной проводили в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи Республики Беларусь [16].

Специфичность методики подтверждали путем растворения осадка (светло-

коричневого цвета) в воде Р, затем анализировали методом жидкостной хроматографии (проводили количественное определение розмариновой кислоты). В результате исследования растворенных осадков было определено содержание розмариновой кислоты в исследуемых водных извлечениях из травы черноголовки лекарственной, которое составило $0,28 \pm 0,06\%$.

Дополнительно специфичность методики подтверждали построением графика (рисунок 6) зависимости массы осадка полисахаридов на фильтре от объема водного извлечения травы черноголовки лекарственной (значение коэффициента корреляции составило 0,9971).

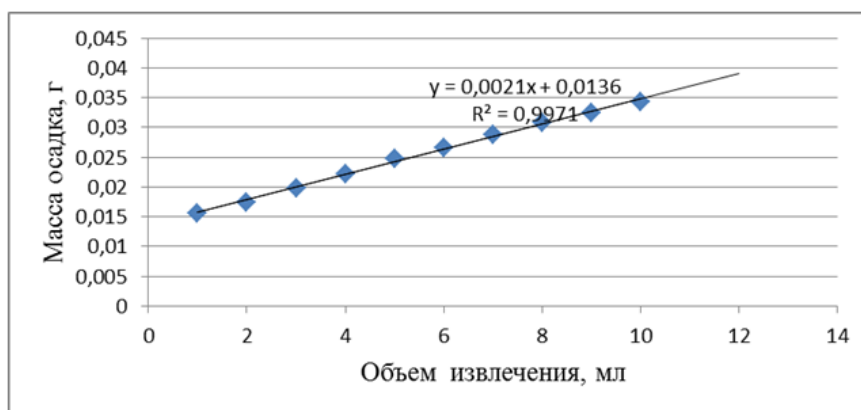


Рисунок 6. – График зависимости массы осадка на фильтре от объема водного извлечения травы черноголовки лекарственной

Правильность методик определяли методом добавок. В качестве стандарта использовали крахмал (крахмал картофельный, ОДО «Ракан – Крупяной Дом», дата изготовления – 02.03.2017, дата упаковки – 22.03.2017). Результаты оценки правильности представлены в таблице 3.

Точность методики оценивали на двух уровнях: сходимость результатов ($n = 10$, $P = 0,95$, таблица 4) и внутрилабораторная точность (таблица 5), где оценивались результаты эксперимента, проводимого в разные дни и разными аналитиками (статистически значимых различий не наблюдалось).

Таблица 3. – Правильность методики гравиметрического определения суммы полисахаридов в водном извлечении травы чернойголовки лекарственной (n = 3, P = 95%)

Введено крахмала, мг	Найдено крахмала, мг	Найдено относительно введенного, %	RSD, %
12	11,7	97,2	2,73
21	20,6	98,3	2,14
30	29,9	99,8	0,81

Таблица 4. – Параметры сходимости результатов количественного определения суммы полисахаридов в водном извлечении травы чернойголовки лекарственной (n = 10, P = 95%)

x_{cp} (%)	S	S_r	t (P, v)	Δx	ε , %
11,2	0,2	0,018	2,262	0,14	1,26

Таблица 5. – Параметры внутрилабораторной точности результатов количественного определения суммы полисахаридов в водном извлечении травы чернойголовки лекарственной (n=10, P= 95%)

	x_{cp} (%)	S	S_r	Δx	ε , %	$F_{выч}$	$F_{табл} (P_1, v_1, v_2), P = 0,99$
1	11,2	0,2	0,02	0,1	1,3	1,761	5,351
2	11,3	0,3	0,02	0,2	1,6		

На основании полученных данных нами предложена методика количественного определения суммы водорастворимых полисахаридов в водном извлечении травы чернойголовки лекарственной.

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 1 мм. 2,00 г измельченного сырья (1000) помещают в коническую колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 100 мл горячей воды Р и нагревают с обратным холодильником при температуре 80°C на водяной бане при периодическом перемешивании в течение 30 минут. Собирают надосадочную жидкость, процеживают через ватный тампон и доводят водой Р до объема 100,0 мл. К 25,0 мл полученного раствора прибавляют 75 мл 96% спирта Р, перемешивают и оставляют для осаждения на 15 минут. Надосадочную жидкость фильтруют под вакуумом через высушенный при температуре от 100°C до 105°C до постоянной массы стеклянный фильтр диаметром 40 мм. Фильтр с осадком высушивают сначала на воздухе, а затем при температуре от 100°C до 105°C до постоянной массы.

Содержание полисахаридов в траве чернойголовки лекарственной в процентах рассчитывают по формуле:

$$x = \frac{(m_2 - m_1) \cdot 400}{m},$$

где m_1 – масса фильтра, г; m_2 – масса фильтра с осадком, г; m – масса навески испытуемого сырья, г.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, оптимальными условиями экстракции комплекса водорастворимых полисахаридов из травы чернойголовки лекарственной являются однократная экстракция горячей водой (в момент попадания на сырье) при температуре 80°C на водяной бане в течение 30 минут, соотношение сырья и экстрагента – 1:50, измельченность сырья – 1000 мкм.

Разработанная методика соответствует требованиям Государственной фармакопеи Республики Беларусь по таким параметрам, как специфичность, правильность, сходимость и внутрилабораторная точность.

SUMMARY

D.S. Korolyova
DEVELOPMENT AND VALIDATION OF WATER-SOLUBLE POLYSACCHARIDES ASSAY TECHNIQUES IN THE HERB OF PRUNELLA VULGARIS

As a results of experiment were determined optimal conditions for extraction of polysaccharides from herb of Prunella vulgaris (extractant – hot water, extraction time – 30 minutes, the extraction temperature – 80°C, the ratio of raw material and the extractant – 1:50, grinding the raw material – 1mm).

The technique is validated in terms of specificity, accuracy, repeatability and intermediate precision.

Keywords: *Prunella vulgaris* herb, complex of water-soluble polysaccharides, assay, validation.

ЛИТЕРАТУРА

1. Куркин, В. А. Основы фитотерапии: учебное пособие для студентов фармацевтических вузов / В. А. Куркин. – Самара: ООО «Офорт», ГОУ ВПО «СамГМУ Росздрава», 2009. – 963 с.

2. Лекарственные растения – дикорастущие / Под ред. А. Ф. Гаммерман. – Минск, 1967. – 370 с.

3. Растительные ресурсы России: Дикорастущие цветковые растения, их компонентный состав и биологическая активность; Семейство Caprifoliaceae – Lobeliaceae. – СПб.; М.: Товарищество научных изданий КМК, 2011. – Т. 4. – 630 с.

4. Ибрагимов, Ф. И. Основные лекарственные средства китайской медицины / Ф. И. Ибрагимов, В. С. Ибрагимова. – Москва, 1960. – 412 с.

5. Tabb, H. D. Isolation, purification, and partial characterization of prunellin, an anti-HIV component from aqueous extracts of *Prunella vulgaris* / H. D. Tabb, R. S. Chang, K. M. Smith // *Antiviral Res.* – 1989. – Vol. 11, № 5–6. – P. 263–273.

6. Yao, X. J. Mechanism of inhibition of HIV-1 infection in vitro by purified extract of *Prunella vulgaris* / X. J. Yao, M. A. Wainberg, M. A. Parniak // *Virology.* – 1992. – Vol. 187. – P. 56–62.

7. Antiviral traditional medicines against herpes simplex virus (HSV-1), poliovirus, and measles virus in vitro and their therapeutic efficacies for HSV-1 infection in mice / M. Kurokawa [et al.] // *Antiviral Res.* – 1993. – Vol. 22. – P. 175–188.

8. Chemical properties, mode of action, and in vivo anti-herpes activities of a lignin-carbohydrate complex from *Prunella vulgaris* / Y. Zhang [et al.] // *Antiviral Res.* – 2007. – Vol. 75, № 3. – P. 242–249.

9. Chiu, L. C. A polysaccharide fraction from medicinal herb *Prunella vulgaris* down regulates the expression of herpes simplex virus antigen in Vero cells / L. C. Chiu, W. Zhu, V. E. Ooi // *J Ethnopharmacology.* – 2004. – Vol. 93, № 1. – P. 63–68.

10. Immunostimulatory activity of aqueous extract isolated from *Prunella vulgaris* / E. H. Han [et al.] // *Food Chem. Toxicol.* –

2009. – Vol. 47, № 1. – P. 62–69.

11. Shin, T. Y. Inhibition of Immediate-type allergic reactions by *Prunella vulgaris* in a murine model / T. Y. Shin, Y. K. Kim, H. M. Kim // *Immunopharmacol., immunotoxicol.* – 2001. – Vol. 23, № 3. – P. 423–435.

12. Lee, H. Antimutagenic activity of extracts from anticancer drugs in Chinese medicine / H. Lee, J. Y. Lin // *Mutation Research – Genetic Toxicology.* – 1988. – Vol. 204, №2. – P. 229–234.

13. Государственная фармакопея Республики Беларусь (ГФ РБ II): Разработана на основе Европейской фармакопеи. В 2 т. Т. 2. Контроль качества субстанций для фармацевтического использования и лекарственного растительного сырья / М-во здравоохран. Респ. Беларусь, УП «Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении»; под общ. ред. С.И. Марченко. – 2-е изд. – Молодечно: Тип. «Победа», 2016. – 1368 с.

14. Tsurkan, O. O. Technology and analysis of water-soluble polysaccharide from common self-heal inflorescences (*Prunella vulgaris* L.) / O. O. Tsurkan, O. I. Golembiowska // International interdisciplinary scientific conference Biologically active substances and materials: fundamental and applied problems. – Novy Svet, AR Crimea, May 27 – June 1, 2013. – P. 356.

15. Дмитрук, С. И. Химический состав и биологическая активность черноголовки обыкновенной: автореф. дис. ... канд. фарм. наук / С. И. Дмитрук. – Пятигорск, 1989. – 21 с.

16. Государственная фармакопея Республики Беларусь (ГФ РБ II): Разработана на основе Европейской фармакопеи. В 2 т. Т. 1. Общие методы контроля лекарственных средств / М-во здравоохран. Респ. Беларусь, УП «Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении»; под общ. ред. А.А. Шерякова. – Молодечно: Тип. «Победа», 2012. – 1220 с.

Адрес для корреспонденции:

210023, Республика Беларусь,
г. Витебск, пр. Фрунзе, 27,
УО «Витебский государственный
ордена Дружбы народов
медицинский университет»,
кафедра фармакогнозии с курсом ФПК и ПК,
тел. 8 0212 64 81 78,
Королева Д.С.

Поступила 05.04.2018 г.